

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2003-531915

(P2003-531915A)

(43)公表日 平成15年10月28日 (2003.10.28)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード <sup>*</sup> (参考)
A 6 1 K 48/00	Z NA	A 6 1 K 48/00	Z NA 4 B 0 2 4
31/7115		31/7115	4 B 0 6 5
31/712		31/712	4 C 0 5 7
31/7125		31/7125	4 C 0 8 4
A 6 1 P 37/04		A 6 1 P 37/04	4 C 0 8 6

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 32 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2001-580927(P2001-580927)
(86) (22)出願日	平成13年4月30日 (2001.4.30)
(85)翻訳文提出日	平成14年11月1日 (2002.11.1)
(86)国際出願番号	PCT/US01/13682
(87)国際公開番号	WO01/083503
(87)国際公開日	平成13年11月8日 (2001.11.8)
(31)優先権主張番号	60/201,578
(32)優先日	平成12年5月1日 (2000.5.1)
(33)優先権主張国	米国 (U.S.)

(71)出願人	ハイブリドン・インコーポレイテッド HYBRIDON, INC. アメリカ合衆国02139マサチューセッツ州 ケンブリッジ、バッサー・ストリート345 番
(72)発明者	アグラワル、サディール アメリカ合衆国マサチューセッツ州01545、 シュルーズベリー、ランブライター ドラ イブ 61
(74)代理人	弁理士 葛和 清司

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヌクレオシドの位置的修飾によるオリゴヌクレオチドCpG誘導性免疫刺激の調節

(57)【要約】

本発明は、CpG-ジヌクレオチド含有化合物により生じた免疫応答を調節するための方法を提供する。本発明の方法は、アンチセンス用途についての免疫刺激効果を減少させることおよび免疫療法用途についての免疫刺激効果を増大させることを、共に可能にする。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 免疫調節部分を、CpGジヌクレオチドに対して、5'側または3'側のいずれかの位置に導入することによる、CpGジヌクレオチド含有化合物の免疫刺激効果を調節するための方法。

【請求項2】 化合物がさらに、追加のオリゴヌクレオチド配列を含む、請求項1に記載の方法。

## 【請求項3】 化合物が、構造

5' - Y<sub>n</sub> . . . Y<sub>6</sub> - Y<sub>5</sub> - Y<sub>4</sub> - Y<sub>3</sub> - Y<sub>2</sub> - Y<sub>1</sub> - CG - X<sub>1</sub> - X<sub>2</sub> - X<sub>3</sub> - X<sub>4</sub> - X<sub>5</sub> - X<sub>6</sub> - X<sub>7</sub> - X<sub>8</sub> - X<sub>9</sub> . . . X<sub>m-3</sub>'

式中、Cはシトシンであり、Gはグアノシン、イノシンおよび7-デアザグアノシンを含む置換グアノシンであり、および各々のXおよびYは、独立して、ヌクレオシドまたは免疫調節部分であり、およびnは、-9～+20の数であり、およびmは、-6～+20の数である、

を有する、請求項2に記載の方法。

【請求項4】 免疫調節部分が、アベーシックヌクレオシド、1, 3-プロパンジオールリンカー（置換または非置換）、ニトロピロール、ニトロインドール、デオキシウリジン、イノシン、イソグアノシン、2-アミノプリン、ネブライン、7-デアザグアノシン、4-チオデオキシウリジン、4-チオチミジン、d-イソグアノシン、d-イソ-5-メチルシトシン、P-塩基、および3' - 3' 結合からなる群から選択されている、請求項3に記載の方法。

【請求項5】 増大したかまたは減少した免疫刺激効果を有する化合物であって、該化合物が、CpGジヌクレオチドおよび免疫調節部分を含み、ここで、増大したかまたは減少した免疫調節効果が、免疫調節部分を欠いている同様の化合物と比較したものである、前記化合物。

【請求項6】 化合物がさらに、追加のオリゴヌクレオチド配列を含む、請求項5に記載の化合物。

## 【請求項7】 化合物が、構造

5' - Y<sub>n</sub> . . . Y<sub>6</sub> - Y<sub>5</sub> - Y<sub>4</sub> - Y<sub>3</sub> - Y<sub>2</sub> - Y<sub>1</sub> - CG - X<sub>1</sub> - X<sub>2</sub> - X<sub>3</sub> - X<sub>4</sub> - X<sub>5</sub> - X<sub>6</sub> - X<sub>7</sub> - X<sub>8</sub> - X<sub>9</sub> . . . X<sub>m-3</sub>'

式中、Cはシトシンであり、Gはグアノシン、イノシンおよび7-デアザグアノシンを含む置換グアノシンであり、および各々のXおよびYは、独立して、ヌクレオシドまたは免疫調節部分であり、およびnは、-9～+20の数であり、およびmは、-6～+20の数である、

を有する、請求項6に記載の化合物。

**【請求項8】** 免疫調節部分が、アベーシックヌクレオシド、1, 3-プロパンジオールリンカー、ニトロピロール、ニトロインドール、デオキシリジン、イノシン、イソグアノシン、2-アミノプリン、ネブラリン、7-デアザグアノシン、4-チオデオキシリジン、4-チオチミジン、d-イソグアノシン、d-イソ-5-メチルシトシン、P-塩基、および3'-3'結合からなる群から選択されている、請求項7に記載の化合物。

**【請求項9】** オリゴヌクレオチド配列が、遺伝子に対して相補的である、請求項8に記載の化合物。

**【請求項10】** オリゴヌクレオチドが、遺伝子に対して相補的ではない、請求項8に記載の化合物。

**【請求項11】** 哺乳類における遺伝子の発現におけるアンチセンス特異的減少を得るための方法であって、該方法が、哺乳類に、遺伝子に対して相補的であり、CpGジヌクレオチドおよび免疫調節部分を含むオリゴヌクレオチドを投与することを含み、ここで、該オリゴヌクレオチドが、免疫調節部分を欠いている同様のオリゴヌクレオチドよりも低い免疫刺激効果を有する、前記方法。

**【請求項12】** 哺乳類がヒトである、請求項11に記載の方法。

**【請求項13】** オリゴヌクレオチドが、オリゴヌクレオチド中に存在する各々のCpGジヌクレオチドについて、1つのみの免疫調節部分を有する、請求項11に記載の方法。

**【請求項14】** オリゴヌクレオチドが、1つのみの免疫調節部分を有する、請求項13に記載の方法。

**【請求項15】** オリゴヌクレオチドの投与が、非経口、経口、舌下、経皮的、局所的、鼻腔内、気管内または直腸内である、請求項11に記載の方法。

**【請求項16】** オリゴヌクレオチドを、約0.01マイクロモル～約10

マイクロモルの、オリゴヌクレオチドの血中レベルを達成するのに十分な投与量で投与する、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 7】 オリゴヌクレオチドの投与量が、患者あたり 1 日約 0. 1 m g のオリゴヌクレオチド～体重 1 k g あたり 1 日約 2 0 0 m g のオリゴヌクレオチドである、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 8】 哺乳類における免疫応答を誘発する方法であって、該方法が、哺乳類に、C p G ジヌクレオチドおよび免疫調節部分を含む化合物を投与することを含み、ここで、該化合物が、免疫調節部分を欠いている同様の化合物よりも大きい免疫刺激効果を有する、前記方法。

【請求項 1 9】 哺乳類がヒトである、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】 化合物の投与が、非経口、経口、舌下、経皮的、局所的、鼻腔内、気管内または直腸内である、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 1】 化合物を、約 0. 0 1 マイクロモル～約 1 0 マイクロモルの、オリゴヌクレオチドの血中レベルを達成するのに十分な投与量で投与する、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 2】 化合物の投与量が、患者あたり 1 日約 0. 1 m g ～体重 1 k g あたり 1 日約 2 0 0 m g である、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 3】 化合物を、ワクチンと組み合わせて投与する、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 4】 さらに、アジュバントを投与することを含む、請求項 2 3 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

発明の背景発明の分野

本発明は、アンチセンス方法におけるオリゴヌクレオチドの治療的使用、および免疫刺激剤としての、オリゴヌクレオチドの治療的使用の両方に関する。

## 【0002】

関連技術の概要

オリゴヌクレオチドは、現代の分子生物学における必須の手段となり、PCRの診断プローブ法から遺伝子発現のアンチセンス阻害に至るまで、広範囲の手法において用いられている。オリゴヌクレオチドのこの広範囲の使用により、オリゴヌクレオチドを合成するための迅速、安価かつ効率的な方法に対する増大する要求がもたらされた。

## 【0003】

アンチセンスおよび診断用途のためのオリゴヌクレオチドの合成は、現在では常習的に達成することができる。例えば、*Methods in Molecular Biology, Vol 20: Protocols for Oligonucleotides and Analogs* 165～189頁(S. Agrawal編、Humana Press, 1993); *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, 87～108頁(F. Eckstein編、1991); およびUhlmannおよびPeyman, 前記、AgrawalおよびIyer, *Curr. Op. in Biotech.* 6: 12 (1995); およびAntisense Research and Applications (CrookeおよびLebleu編、CRC Press, Boca Raton, 1993)を参照。初期の合成方法は、ホスホジエステルおよびホスホトリエステル化学を含んでいた。

## 【0004】

Khorana et al., *J. Molec. Biol.* 72: 209 (1972)には、オリゴヌクレオチド合成のためのホスホジエステル化学が開示されている。Reese, *Tetrahedron Lett.* 34: 3143-3179 (1978)には、オリゴヌクレオチドおよびポリヌクレオチドの合成のためのホスホトリエステル化学が開示されている。これらの初期の方法は、大いに、合成に対する一層効率的なホスホミダイトおよびH-ホスホネート

方法に移行した。BeaucageおよびCaruthers, *Tetrahedron Lett.* 22: 1859-1862 (1981) には、ポリヌクレオチド合成におけるデオキシヌクレオシドホスホラミダイトの使用が開示されている。AgrawalおよびZamecnik、米国特許第5,149,798号(1992)には、H-ホスホネート方法によるオリゴヌクレオチドの最適化された合成が開示されている。

#### 【0005】

これらの現在の方法の両方を用いて、種々の修飾されたヌクレオチド間結合を有するオリゴヌクレオチドが合成された。AgrawalおよびGoodchild, *Tetrahedron Lett.* 28: 3539-3542 (1987) には、ホスホラミダイト化学を用いたオリゴヌクレオチドメチルホスホネートの合成が教示されている。Connolly et al., *Biochemistry* 23: 3443 (1984) には、ホスホラミダイト化学を用いたオリゴヌクレオチドホスホロチオエートの合成が開示されている。Jager et al., *Biochemistry* 27: 7237 (1988) には、ホスホラミダイト化学を用いたオリゴヌクレオチドホスホラミデートの合成が開示されている。Agrawal et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 7079-7083 (1988) には、H-ホスホネート化学を用いたオリゴヌクレオチドホスホラミデートおよびホスホロチオエートの合成が開示されている。

#### 【0006】

さらに最近、数人の研究者が、疾患の治療的処置へのアンチセンス方法の有効性を例証した。Crooke, *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 8: vii-viiiには、ヒトサイトメガロウイルス誘発網膜炎の治療のためのホスホロチオエートオリゴヌクレオチドの好首尾な販売承認が開示されている。不都合なことに、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドの使用は、最初に予測されたよりも、複雑になった。ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドにより生じたある効果は、予測されたアンチセンス機構によっては、説明することができなかった。例えば、McIntyre et al., *Antisense Res. Dev.* 3: 309-322 (1993) には、「センス」ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドが、特異的な免疫刺激を生じることが教示されている。このおよび他の副作用により、ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドについての実態が複雑になった。

#### 【0007】

他方、ホスホジエステルおよびホスホロチオエートオリゴヌクレオチドが、免疫刺激を誘発することができるという観察により、この副作用を、治療的手段として開発する興味が生じた。これらの努力は、ジヌクレオチドCpGを含むホスホロチオエートオリゴヌクレオチドを対象としていた。Kuramoto et al., Jpn. J. Cancer Res. 83: 1128-1131 (1992)には、CpGジヌクレオチドを含むパリンドロームを含むホスホジエステルオリゴヌクレオチドが、インターフェロンアルファおよびガンマ合成を誘発し、ナチュラルキラー活性を増強することができる事が教示されている。Krieg et al., Nature 371: 546-549 (1995)には、ホスホロチオエートCpG含有オリゴヌクレオチドが免疫刺激性であることが開示されている。Liang et al., J. Clin. Invest. 98: 1119-1129 (1996)には、このようなオリゴヌクレオチドがヒトB細胞を活性化させることができることが開示されている。Moldoveanu et al., Vaccine 16: 1216-124 (1998)には、CpG含有ホスホロチオエートオリゴヌクレオチドが、インフルエンザウイルスに対する免疫応答を増強する事が教示されている。McCluskieおよびDavis, The Journal of Immunology 161: 4463-4466 (1998)には、CpG含有オリゴヌクレオチドが、有効なアジュバントとして作用し、B型肝炎表面抗原に対する免疫応答を増強する事が教示されている。

#### 【0008】

これらの報告は、CpG含有オリゴヌクレオチドにより生じた免疫応答を調節することができる必要性があることを明らかにする。理想的には、このような調節は、アンチセンス用途については免疫刺激効果を減少させ、および免疫療法用途については免疫刺激効果を増大させることを含むべきである。

#### 【0009】

##### 発明の概要

本発明は、CpGジヌクレオチド含有化合物により生じた免疫応答を調節する方法を提供する。本発明の方法は、アンチセンス用途については免疫刺激効果を減少させることおよび免疫療法用途については免疫刺激効果を増大させることを、共に可能にする。従って、本発明はさらに、このようなオリゴヌクレオチドを製造し、用いるための用途および方法のいずれについても最適なレベルの免疫刺

激効果を有する化合物を提供する。

#### 【0010】

本発明者は、驚異的なことに、CpG含有オリゴヌクレオチドの位置的修飾(*positional modification*)が、これらの免疫刺激能力に劇的に影響することを見出した。特に、オリゴヌクレオチドの2'または3'糖または塩基修飾あるいは、CpGジヌクレオチドに対する、5'または3'末端修飾を含む、特に5'側または3'側の位置における修飾されたヌクレオシド間結合の導入により、これらの免疫刺激効果が、再現可能かつ予測可能な方式で増大または減少する。

#### 【0011】

第1の観点において、本発明は、免疫調節部分を、CpGジヌクレオチドに対して、5'側または3'側のいずれかの位置において導入することによる、CpGジヌクレオチド含有化合物の免疫刺激効果を調節するための方法を提供する。

#### 【0012】

第2の観点において、本発明は、増大したかまたは減少した免疫刺激効果を有する化合物であって、化合物が、CpGジヌクレオチドおよび免疫調節部分を含み、ここで、増大したかまたは減少した免疫調節効果が、免疫調節部分を欠いている同様の化合物と比較したものである、前記化合物を提供する。

#### 【0013】

第3の観点において、本発明は、ヒトを含む哺乳類における遺伝子の発現におけるアンチセンス特異的減少を得るための方法であって、該方法が、哺乳類に、遺伝子に対して相補的であり、CpGジヌクレオチドおよび免疫調節部分を含むオリゴヌクレオチドを投与することを含み、ここで、オリゴヌクレオチドが、免疫調節部分を欠いている同様のオリゴヌクレオチドよりも低い免疫刺激効果を有する、前記方法を提供する。

#### 【0014】

第4の観点において、本発明は、ヒトを含む哺乳類における免疫応答を誘発する方法であって、該方法が、哺乳類に、CpGジヌクレオチドおよび免疫調節部分を含む化合物を投与することを含み、ここで、該化合物が、免疫調節部分を欠いている同様の化合物よりも大きい免疫刺激効果を有する、前記方法を提供する

### 【0015】

#### 好ましい態様の詳説

本発明は、アンチセンス方法におけるオリゴヌクレオチドの治療的使用、および免疫刺激剤として、オリゴヌクレオチドの治療的使用の両方に関する。本明細書中に引用した特許および刊行物は、当該分野における知識のレベルを反映し、これらの全体が、参照により本出願中に組み込まれる。本明細書中に引用した任意の参考文献の任意の教示と本明細書との間に矛盾がある場合には、本発明に関しては、後者が優勢でなければならない。

### 【0016】

本発明は、CpGジヌクレオチド含有化合物により生じた免疫応答を調節するための方法を提供する。本発明の方法は、アンチセンス用途については免疫刺激効果を減少させることおよび免疫療法用途については免疫刺激効果を増大させることを、共に可能にする。従って、本発明はさらに、このようなオリゴヌクレオチドを製造し、用いるための用途および方法のいずれについても最適なレベルの免疫刺激効果を有するオリゴヌクレオチドを提供する。

### 【0017】

本発明者は、驚異的なことに、CpG含有オリゴヌクレオチドの位置的修飾が、これらの免疫刺激能力に劇的に影響することを見出した。特に、オリゴヌクレオチドの2'または3'糖または塩基修飾あるいは、5'または3'末端修飾を含む、CpGジヌクレオチドに対して、特に5'側または3'側の位置における修飾されたヌクレオシド間結合の導入あるいはこれらの組み合わせにより、これらの免疫刺激効果が、再現可能および予測可能な方式で増大または減少する。

### 【0018】

第1の観点において、本発明は、免疫調節部分を、CpGジヌクレオチドに対して、5'側または3'側のいずれかの位置に導入することによる、CpGジヌクレオチド含有化合物の免疫刺激効果を調節するための方法を提供する。本発明のこの観点における好ましい化合物は、一般的に、追加のオリゴヌクレオチド配列を含む。

## 【0019】

ある好ましい態様において、この方法を用いて、遺伝子または遺伝子転写物に相補的なオリゴヌクレオチドを作成する。ある好ましい態様において、オリゴヌクレオチドは、アンチセンス活性を有する。いくつかの好ましい態様において、オリゴヌクレオチド中に存在する各々のC p Gジヌクレオチドについて1つのみの免疫調節部分がオリゴヌクレオチド中に導入される。いくつかの好ましい態様において、1つのみの免疫調節部分を、オリゴヌクレオチド中に導入する。

ある好ましい態様において、本発明のこの観点により作成されたオリゴヌクレオチドは、アンチセンス活性を有せず、および／または遺伝子に相補的ではない。

。

## 【0020】

ここで、用語「相補的」は、生理学的条件下で、ゲノム領域、遺伝子またはこのRNA転写物にハイブリッド形成する能力を有することを意味する。このようなハイブリッド形成は、通常は、好ましくはワトソン-クリックまたはフーグスティーン型塩基対を形成する相補鎖間の塩基特異的な水素結合の結果であるが、また、他の方式の水素結合および塩基スタッキングにより、ハイブリッド形成がもたらされ得る。実際の問題として、このようなハイブリッド形成は、特異的な遺伝子発現阻害の観察から推論することができる。

## 【0021】

本明細書中で用いる「アンチセンス活性」は、オリゴヌクレオチドが、細胞または動物中に導入された際に、これが相補的である遺伝子の発現の減少を生じることを意味する。

## 【0022】

本発明のこの観点における方法は、単に、直ちに、または他の方法で、C p Gジヌクレオチドの組込みの後の、サイクル中における合成プロセスにおいて適切な免疫調節部分モノマーシントンを用いることにより、十分知られている合成手法のいずれかを用いて、好都合に実施することができる。好ましいモノマーは、ホスホラミダイト、ホスホトリエステルおよびH-ホスホネートを含む。

## 【0023】

本発明に関して、「免疫調節部分を位置Y2へ導入する」は、単に、以下の構造：

5' - Y<sub>n</sub> . . . Y<sub>6</sub> - Y<sub>5</sub> - Y<sub>4</sub> - Y<sub>3</sub> - Y<sub>2</sub> - Y<sub>1</sub> - C G - X<sub>1</sub> - X<sub>2</sub> - X<sub>3</sub> - X<sub>4</sub> - X<sub>5</sub> - X<sub>6</sub> - X<sub>7</sub> - X<sub>8</sub> - X<sub>9</sub> . . . X<sub>m-3</sub> '

式中、Cはシトシンであり、Gはグアノシン、イノシンおよび7-デアザグアノシンを含む置換グアノシンであり、および各々のXおよびYは、独立して、ヌクレオシドまたは免疫調節部分であり、およびnは、-9～+20の数であり、およびmは、-6～+20の数である、

に関して、このような位置に免疫調節部分を有するオリゴヌクレオチドを合成することを意味する。

#### 【0024】

オリゴヌクレオチドの合成のための手順は、当該技術分野において十分知られている。

第2の観点において、本発明は、増大したかまたは減少した免疫刺激効果を有する化合物であって、化合物が、CpGジヌクレオチドおよび免疫調節部分を含み、ここで、増大したかまたは減少した免疫調節効果が、免疫調節部分を欠いている同様の化合物と比較したものである、前記化合物を提供する。本発明のこの観点における好ましい化合物は、一般的に、追加のオリゴヌクレオチド配列を含む。好ましくは、このようなオリゴヌクレオチド配列は、約6～約50個のヌクレオチド、最も好ましくは約12～約35個のヌクレオチドを有することができる。

#### 【0025】

本発明のある好ましい化合物は、構造：

5' - Y<sub>n</sub> . . . Y<sub>6</sub> - Y<sub>5</sub> - Y<sub>4</sub> - Y<sub>3</sub> - Y<sub>2</sub> - Y<sub>1</sub> - C G - X<sub>1</sub> - X<sub>2</sub> - X<sub>3</sub> - X<sub>4</sub> - X<sub>5</sub> - X<sub>6</sub> - X<sub>7</sub> - X<sub>8</sub> - X<sub>9</sub> . . . X<sub>m-3</sub> '

式中、Cはシトシンであり、Gはグアノシン、イノシンおよび7-デアザグアノシンを含む置換グアノシンであり、および各々のXおよびYは、独立して、ヌクレオシドまたは免疫調節部分であり、およびnは、-9～+20の数であり、およびmは、-6～+20の数である、

を有する。

### 【0026】

特に好ましい態様において、化合物を提供するために修飾された塩基配列は、

5' - C T A T C T G A C G T T C T C T G T - 3'

または

5' - C C T A C T A G C G T T C T C A T C - 3'

である。好ましい免疫調節部分は、1種または2種以上のアベーシック (abasic) ヌクレオシド、1, 3-プロパンジオールリンカー (置換または非置換) 、および/またはニトロピロール、ニトロインドール、デオキシウリジン、イノシン、イソグアノシン、2-アミノプリン、ネブラリン、7-デアザグアノシン、4-チオデオキシウリジン、4-チオチミジン、d-イソグアノシン、d-イソ-5-メチルシトシン、P-塩基、および3' - 3' 結合を含む修飾された塩基含有ヌクレオシドを含む。一般的な規則として、位置Y6、Y5、Y4またはY3あるいはこれらの組み合わせにおける免疫調節部分の導入により、オリゴヌクレオチドの免疫刺激効果が増大する。

### 【0027】

一般的に、位置Y2における免疫調節部分の導入により、免疫刺激効果は維持される。一般的に、位置Y1における免疫調節部分の導入により、免疫刺激効果は維持されるかまたは減少する。一般的に、位置Cにおける免疫調節部分の導入により、免疫刺激効果は消失する。一般的に、位置Gにおける免疫調節部分の導入により、免疫刺激効果が維持される7-デアザグアノシンを除いて、免疫刺激効果は消失する。一般的に、位置X1における免疫調節部分の導入により、免疫刺激効果は維持されるかまたは減少する。

### 【0028】

一般的に、位置X2における免疫調節部分の導入は、免疫刺激効果にほとんど影響しない。一般的に、位置X3における免疫調節部分の導入により、免疫刺激効果は維持されるかまたは増大する。一般的に、位置X4、X5、X6、X7～Xmまたはこれらの任意の組み合わせにおける免疫調節部分の導入により、免疫刺激効果は増大する。

**【0029】**

本発明のこの観点における、ある好ましいオリゴヌクレオチドは、遺伝子または遺伝子転写物に相補的である。さらに好ましくは、このようなオリゴヌクレオチドは、アンチセンス活性を有する。いくつかの好ましい態様において、オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド中に存在する各々のCpGジヌクレオチドについて、1つのみの免疫調節部分を有する。いくつかの好ましい態様において、オリゴヌクレオチドは、1つのみの免疫調節部分を有する。他の好ましい態様において、本発明のこの観点における化合物は、アンチセンス活性を有せず、および／または遺伝子に相補的ではない。

**【0030】**

第3の観点において、本発明は、ヒトを含む哺乳類における遺伝子の発現におけるアンチセンス特異的減少を得るための方法であって、該方法が、哺乳類に、遺伝子に対して相補的であり、CpGジヌクレオチドおよび免疫調節部分を含むオリゴヌクレオチドを投与することを含み、ここで、該オリゴヌクレオチドが、免疫調節部分を欠いている同様のオリゴヌクレオチドよりも低い免疫刺激効果を有する、前記方法を提供する。

**【0031】**

いくつかの好ましい態様において、オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチド中に存在する各々のCpGジヌクレオチドについて、1つのみの免疫調節部分を有する。いくつかの好ましい態様において、オリゴヌクレオチドは、1つのみの免疫調節部分を有する。

**【0032】**

本発明のこの観点における方法において、好ましくは、アンチセンスオリゴヌクレオチドの投与は、非経口、経口、舌下、経皮的、局所的、鼻腔内、気管内または直腸内であるべきである。治療組成物の投与は、既知の手順を用いて、疾患の徵候または代用のマーカーを減少させるのに有効な投与量、および期間で実施することができる。全身的に投与された際には、治療組成物は、好ましくは、約0.001マイクロモル～約10マイクロモルのオリゴヌクレオチドの血中レベルを達成するのに十分な投与量で投与する。

## 【003.3】

局所的投与について、これよりもはるかに低い濃度が、有効であり得、はるかに高い濃度が許容され得る。好ましくは、オリゴヌクレオチドの合計投与量は、患者あたり1日約0.1mgのオリゴヌクレオチド～体重1kgあたり1日約200mgのオリゴヌクレオチドの範囲内である。治療に有効な量の1種または2種以上の本発明の治療組成物を、同時にまたは逐次的に、個体に、单一の治療エピソードとして投与するのが望ましいかも知れない。好ましい態様において、組成物を投与した後に、補体活性化、有糸分裂誘発およびトロンビン血餅形成の阻害からなる群から選択された生物学的効果の、1または2以上の測定を行う。

## 【003.4】

本発明のこの観点における方法は、疾患または遺伝子発現の動物モデルにおいて有用であり、さらに、ヒトまたは動物疾患の治療的処置に有用である。

## 【003.5】

第4の観点において、本発明は、ヒトを含む哺乳類における免疫応答を誘発する方法であって、該方法が、哺乳類に、CpGジヌクレオチドおよび免疫調節部分を含む化合物を投与することを含み、ここで、該化合物が、免疫調節部分を欠いている同様の化合物よりも大きい免疫刺激効果を有する、前記方法を提供する。

## 【003.6】

本発明のこの観点における方法において、好ましくは、化合物の投与は、非経口、経口、舌下、経皮的、局所的、鼻腔内、気管内または直腸内であるべきである。治療的組成物の投与は、既知の手順を用いて、疾患の徵候または代用のマーカーを減少させるのに有効な投与量、および期間で実施することができる。全身的に投与された際には、治療組成物は、好ましくは、約0.001マイクロモル～約10マイクロモルのオリゴヌクレオチドの血中レベルを達成するのに十分な投与量で投与する。

## 【003.7】

局所的投与について、これよりもはるかに低い濃度が、有効であり得、はるかに高い濃度が許容され得る。好ましくは、オリゴヌクレオチドの合計投与量は、

患者あたり 1 日約 0.1 mg のオリゴヌクレオチド～体重 1 kg あたり 1 日約 200 mg のオリゴヌクレオチドの範囲内である。治療に有効な量の 1 種または 2 種以上の本発明の治療組成物を、同時にまたは逐次的に、個体に、単一の治療エピソードとして投与するのが望ましいかも知れない。好ましい態様において、組成物を投与した後に、補体活性化、有糸分裂誘発およびトロンビン血餅形成の阻害からなる群から選択された生物学的効果の、1 または 2 以上の測定を行う。

#### 【0038】

ある好ましい態様において、本発明の化合物を、ワクチン、抗体、細胞毒、アンチセンスオリゴヌクレオチド、遺伝子療法ベクター、DNA ワクチンおよび／またはアジュバントと組み合わせて投与して、免疫応答の特異性または規模を増大する。化合物またはワクチンのいずれか、または両方を、随意に、免疫原性タンパク質、例えばキーホールリンペットヘモシアニン、コレラ毒素 B サブユニットまたは任意の他の免疫原性担体タンパク質に結合させることができる。限定せずに、完全フロイントアジュバントを含む、多くの任意のアジュバントを、用いることができる。

#### 【0039】

この観点に関して、「組み合わせて」は、同一の患者において同一の疾患を治療する経過において、を意味し、オリゴヌクレオチドおよび／またはワクチンおよび／またはアジュバントを、同時投与および数日間隔までの一時的に離間した順序を含む任意の順序で投与することを含む。このような組み合わせ治療はまた、オリゴヌクレオチドおよび／または独立してワクチンおよび／または独立してアジュバントの 1 回より多い投与を含むことができる。オリゴヌクレオチドおよび／またはワクチンおよび／またはアジュバントの投与は、同一のまたは異なる経路によることができる。

#### 【0040】

本発明のこの観点における方法は、免疫系のモデル研究のために有用であり、さらに、ヒトまたは動物疾患の治療的処置に有用である。

#### 【0041】

本発明のすべての観点に関して、用語「オリゴヌクレオチド」は、2 または 3

以上のデオキシリボヌクレオチドのポリマー、または、2' - ハローヌクレオシド、2' または3' 置換、2' または3' - O-置換リボヌクレオシド、デアザヌクレオシドまたはこの任意の組み合わせを含む、任意の修飾されたヌクレオシドを含む。このようなモノマーを、互いに、既知のヌクレオシド間結合のいずれかにより結合させることができる。ある好ましい態様において、これらのヌクレオシド間結合は、ホスホジエステル、ホスホトリエステル、ホスホロチオエートまたはホスホラミデート結合、前記の任意の2' - 5' 結合あるいはこれらの組み合わせであってもよい。

#### 【0042】

用語オリゴヌクレオチドはまた、化学的に修飾された塩基または糖を有し、および/または、限定せずに、親油性基、挿入剤、ジアミンおよびアダマンタンを含む、追加の置換基を有するこのようなポリマーを包含する。用語オリゴヌクレオチドはまた、PNA、LNA、および非ペントース糖（例えばヘキソース）主鎖または主鎖部分を含む、オリゴヌクレオチドを包含する。本発明に関して、用語「2' - O-置換」および「3' - O-置換」は、（それぞれ）ペントース部分の2'（または3'）位置の、ハロゲン（好ましくはCl、BrまたはF）、または1～6個の飽和または不飽和炭素原子を含む-O-低級アルキル基での、あるいは、2～6個の炭素原子を有する-O-アリールまたはアリル基での置換を意味し、ここで、このようなアルキル、アリールまたはアリル基は、非置換であってもよく、または、例えば、ハロ、ヒドロキシ、トリフルオロメチル、シアノ、ニトロ、アシル、アシルオキシ、アルコキシ、カルボキシル、カルバルコキシルまたはアミノ基で置換されていてもよく；または、このような2'置換は、水酸基（リボヌクレオシドを生成するため）、アミノまたはハロ基によるものでもよいが、2'（または3'）H基によるものではない。

#### 【0043】

本発明のすべての観点に関して、用語「CpG」または「CpGジヌクレオチド」は、ジヌクレオチド5' - デオキシシチジン-デオキシグアニジンまたはデオキシグアニジン類似体-3'を意味し、ここで、pは、ヌクレオチド間結合であり、およびここで、ジヌクレオチドの糖主鎖は、リボース、デオキシリボース

または2' 置換リボースまたはこれらの組み合わせであってもよい。本発明の最初の3つの観点の好ましい態様において、pは、ホスホジエステル、ホスホロチオエート、アルキルホスホネート、ホスホトリエステル、立体特異性(RpまたはSp)ホスホロチオエートまたはアルキルホスホネートおよび前述の任意の2' - 5' 共有結合から選択される。非ホスホジエステル、非ホスホロチオエートの態様は、さらに、免疫刺激効果を低下させ得る。本発明の最後の3つの観点の好ましい態様において、pは、ホスホジエステル、ホスホロチオエートおよびホスホロジチオエートから選択される。

#### 【0044】

以下の例は、本発明のある好ましい態様をさらに例示することを意図し、本発明の範囲を限定することを意図しない。

#### 【0045】

##### 例1

###### インビトロでの免疫刺激効果の調節

CpGモチーフを含むPSオリゴの化学修飾の部位の影響を研究するために、本発明者等は、2種のオリゴヌクレオチドを選択した。各々が1つのCpGモチーフを含む、オリゴ1およびオリゴ2である。本研究においてオリゴヌクレオチドの免疫刺激活性を評価するために、本発明者等は、マウス脾臓細胞増殖アッセイを用いる。

#### 【0046】

マウス脾臓リンパ球を、0.1、1および10 $\mu$ g/m1の濃度のオリゴヌクレオチドと共に培養した。オリゴ1およびオリゴ2は、細胞増殖に対して用量依存性の効果を誘発する。0.1 $\mu$ g/m1において、増殖係数は増大する。オリゴ1またはオリゴ2のCpGモチーフの5' - フランキングデオキシヌクレオシド(Y1)の、本発明の免疫調節部分による置換により、用いたすべての濃度において、細胞増殖の完全な抑制がもたらされる(図1)。0.1 $\mu$ g/m1において、細胞増殖係数は、培地のみのものに類似する。オリゴ1またはオリゴ2のCpGモチーフの3' - フランキングデオキシヌクレオシド(X1)の、2' - OMeによる置換は、細胞増殖に対するこのような影響を有しないが、これをわ

ずかに減少し得る。同様の置換を、CpGモチーフに対する3' - フランギング領域において、オリゴ1またはオリゴ2において実施した。デオキシヌクレオシドが、位置X3、X4、X5またはX6において、本発明の免疫調節部分により置換されているオリゴを合成した。これらのオリゴの増殖係数は、増大する。

### 【0047】

#### 例2

##### 脾臓重量に対する免疫調節部分の効果

前述の置換が、細胞培養アッセイに基づくこの免疫刺激活性を調節することを観察した後に、本発明者等は、前記置換が、インビボで類似する効果を有することを確認するために、表1に列挙するオリゴヌクレオチドを、マウスに腹腔内に投与し、脾臓重量を測定した。オリゴ1またはオリゴ2の投与は、脾臓重量の顕著な増加を生じる。CpGモチーフから5' - 末端の方向へ離れた、位置Y6、Y5、Y4またはY3のデオキシヌクレオチドの置換は、脾臓重量の漸進的な増加を生じ、これは、これらの免疫刺激活性の増加を確認するものである。一般的に、CpGモチーフの3' - 末端の方向のデオキシヌクレオシドの置換は、脾臓重量におけるあまり顕著でない増加を生じる。データを、図2および3に示す。

### 【0048】

#### 例3

##### 免疫調節部分を含むオリゴヌクレオチドの合成

オリゴヌクレオチドを、自動DNA合成装置(Expedite 8909, PerSeptive Bio systems, Foster City, CA)を用いて、1マイクロモル規模で合成した。標準的なデオキシヌクレオシドホスホラミダイトは、PerSeptive Biosystemsから得られる。1' , 2' -ジデオキシリボースホスホラミダイト、プロピル-1-ホスホラミダイト、2' -デオキシ-5-ニトロインドールリボフラノシルホスホラミダイト、デオキシウリジンホスホラミダイト、dPホスホラミダイト、d-2-アミノプリンホスホラミダイト、d-ネブラリンホスホラミダイトおよびd-7-デアザグアニンホスホラミダイトは、Glen Research (Sterling, VA)から得られる。デオキシイノシンホスホラミダイトは、ChemGenes (Ashland, MA)から得られる。

## 【0049】

通常のカップリングサイクルを、すべてのホスホラミダイトについて用いた。ビューケージ(Beaucage)試薬を酸化体(oxidant)として用いて、ホスホロチオエート修飾を得た。合成後、オリゴヌクレオチドを、CPG-結合オリゴヌクレオチドを濃縮水酸化アンモニウム溶液と共に1.5~2時間室温でインキュベートし、次に水酸化アンモニウム上清液を12時間、55°Cでインキュベートすることにより、脱保護した。水酸化アンモニウム溶液を、speed-vacにおいて蒸発乾固し、5'-DMTr-オリゴヌクレオチドを、C18逆相マトリックスにおけるHPLCにより、0.1M酢酸アンモニウムおよび1:5比率のアセトニトリル中の0.1M酢酸アンモニウムの溶媒系を用いて精製した。次に、オリゴヌクレオチドを、80%酢酸で処理して、DMTr基を除去し、ナトリウム形態に転化し、蒸留水に対して透析することにより脱塩した。オリゴヌクレオチドを凍結乾燥し、水中に再溶解した。特徴づけを、変性PAGEおよびMALDI-TOF質量分析法により、達成した。

## 【図面の簡単な説明】

## 【図1A】

本発明の免疫調節部分の好ましい態様を示した図である。該図は、X3X4を3'側について用い、X1X2を5'側について用いていることに注意されたい。この使用は、この図についてのみ例示的であり、本明細書中で教示されるYおよびX表示を用いる特許請求の範囲を解釈するために用いるべきではない。

## 【図1B-1】

本発明の免疫調節部分の好ましい態様を示した図である。該図は、X3X4を3'側について用い、X1X2を5'側について用いていることに注意されたい。この使用は、この図についてのみ例示的であり、本明細書中で教示されるYおよびX表示を用いる特許請求の範囲を解釈するために用いるべきではない。

## 【図1B-2】

本発明の免疫調節部分の好ましい態様を示した図である。該図は、X3X4を3'側について用い、X1X2を5'側について用いていることに注意されたい。この使用は、この図についてのみ例示的であり、本明細書中で教示されるYおよ

およびX表示を用いる特許請求の範囲を解釈するために用いるべきではない。

【図1B-3】

本発明の免疫調節部分の好ましい態様を示した図である。該図は、X3X4を3'側について用い、X1X2を5'側について用いていることに注意されたい。この使用は、この図についてのみ例示的であり、本明細書中で教示されるYおよびX表示を用いる特許請求の範囲を解釈するために用いるべきではない。

【図1B-4】

本発明の免疫調節部分の好ましい態様を示した図である。該図は、X3X4を3'側について用い、X1X2を5'側について用いていることに注意されたい。この使用は、この図についてのみ例示的であり、本明細書中で教示されるYおよびX表示を用いる特許請求の範囲を解釈するために用いるべきではない。

【図2A】

本発明の修飾された化合物を示した図である。

【図2B】

図2Aの化合物を用いた脾臓アッセイの結果を示した図である。

【図3A】

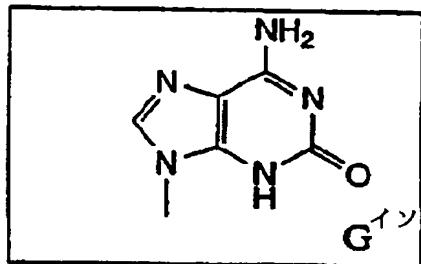
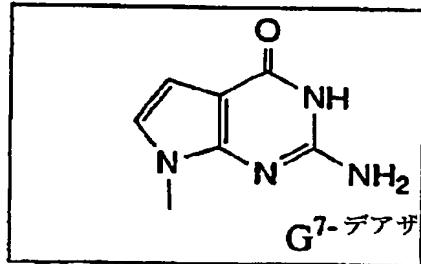
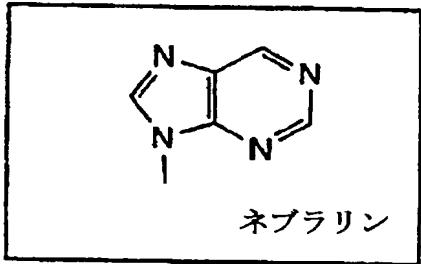
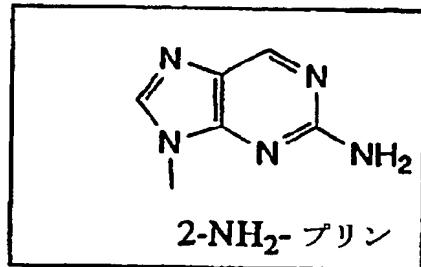
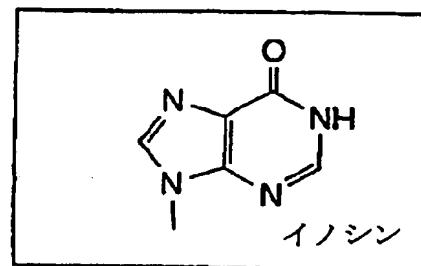
本発明の他の修飾された化合物を示した図である。

【図3B】

図3Aの化合物を用いた脾臓アッセイの結果を示した図である。

【図1A】

研究において用いたグアノシンの修飾



【図1B-1】

5'-NNNNX1X2CGX3X4NNNN-3'.

アベーシック (1',2'-デオキシリボース)

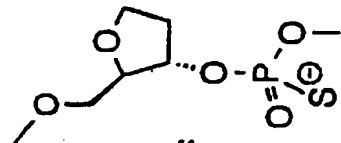
オリゴ 91-3:  $X_1 = R, X_2 = A, X_3 = T, X_4 = T$ オリゴ 91-4:  $X_2 = R, X_1 = G, X_3 = T, X_4 = T$  $R =$ 

図 1B-1

【図1B-2】

5'-NNNNX1X2CGX3X4NNNN-3'.

アベーシック(1,3-プロパンジオール)

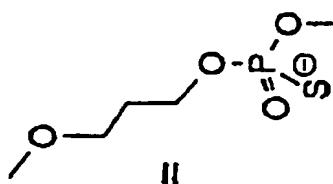
オリゴ 109-4:  $X_1 = R, X_2 = A, X_3 = T, X_4 = T$  $R =$ 

図 1B-2

【図1B-3】

5'-NNNNX1X2CGX3X4NNNN-3'.

3-トロピロール

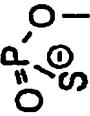
オリゴ 105-4:  $X_1 = R, X_2 = A, X_3 = T, X_4 = T$ オリゴ 105-3:  $X_2 = R, X_1 = G, X_3 = T, X_4 = T$ R = 

図 1B-3

【図1B-4】

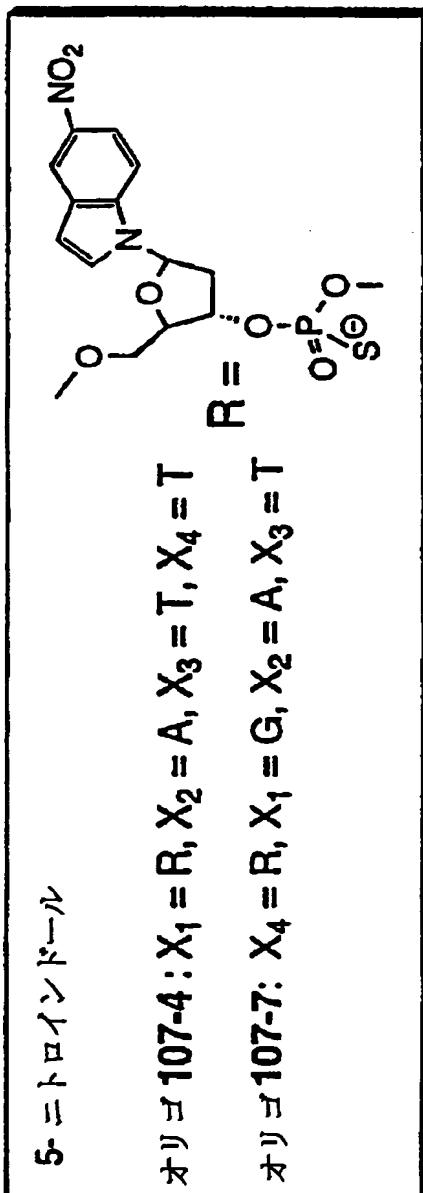
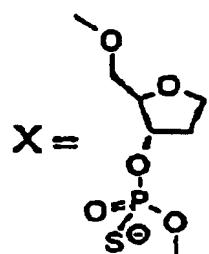
5'-NNNNX1X2CGX3X4NNNN-3'.

図 1B-4

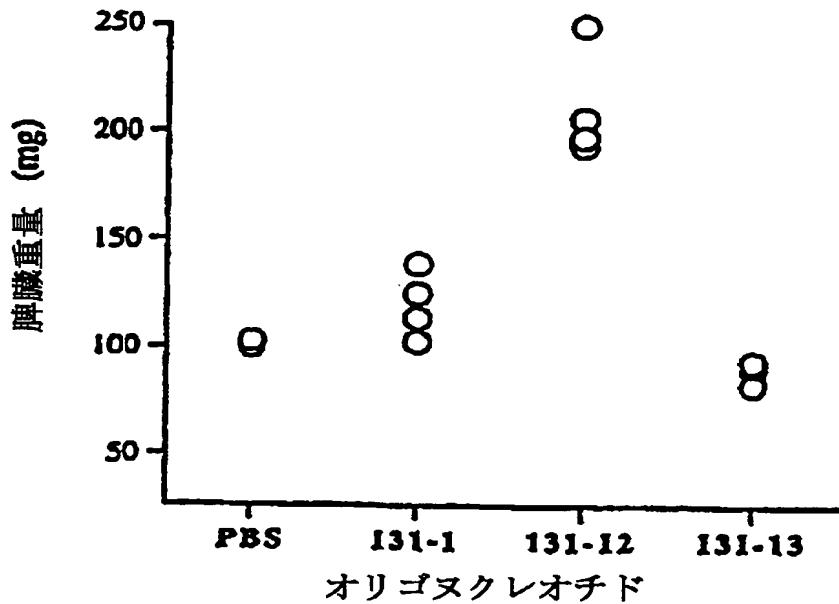
【図2A】

1',2'-ジデオキシリボース置換

HYB 番号	配列および修飾 (5'-3')	バッチ番号
HYB1158	CTATCTGAC <u>GGT</u> TCTCTGT	D7-131-1
HYB1160	CTAXXTGACGTTCTCTGT	D7-131-12
HYB1161	CTATCTGAXGTTCTCTGT	D7-131-13



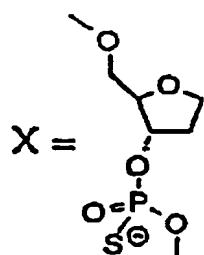
【図2B】



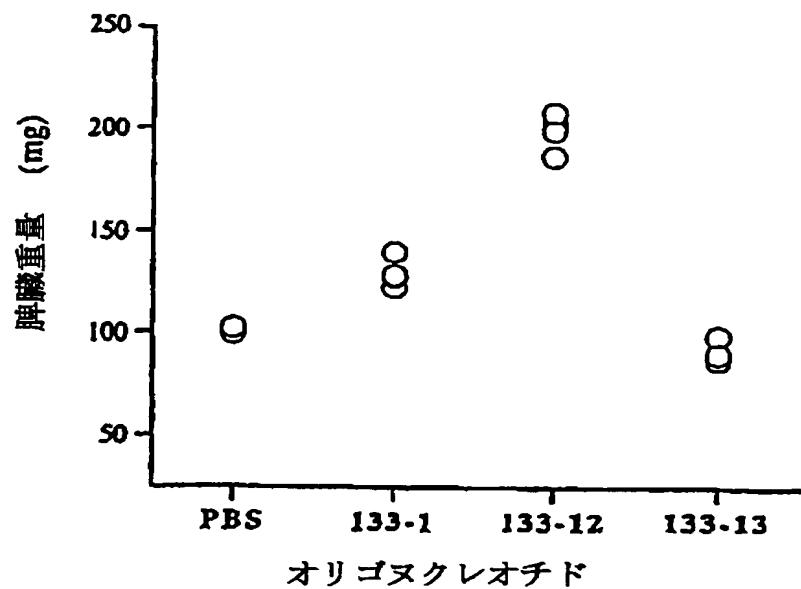
【図3A】

## 1', 2'-ジデオキシリボソース置換

HYB 番号	配列および修飾 (5'-3')	バッチ番号
HYB1159	CCTACTAG <u>CG</u> TTCTCATC	D7-133-1
HYB1162	CCTXXTAGCGTTCTCATC	D7-133-12
HYB1163	CCTACTAGXGTTCTCATC	D7-133-13



【図3B】



## 【国际調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/US 01/13682

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 C07H21/00 A61K31/7088 A61P37/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZHAO Q ET AL: "Site of Chemical Modifications in CpG Containing Phosphorothioate Oligodeoxynucleotide Modulates its Immunostimulatory Activity" BIOORGANIC & MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS, vol. 9, no. 24, 20 December 1999 (1999-12-20), pages 3453-3458, XP004185533 ISSN: 0960-894X the whole document	1-3, 5-7, 10, 11, 13, 14, 18
X	WO 98 49288 A (HYBRIDON INC) 5 November 1998 (1998-11-05) the whole document	5-7
A	-----	15-17, 20-24

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

\*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

3 May 2002

Date of mailing of the International search report

21/05/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Andres, S

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

page 1 of 2

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/US 01/13682

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>MOLDOVEANU Z ET AL: "CpG DNA, a novel immune enhancer for systemic and mucosal immunization with influenza virus" VACCINE, vol. 16, no. 11-12, 1 July 1998 (1998-07-01), pages 1216-1224, XP004124527 ISSN: 0264-410X cited in the application the whole document</p> <p>—</p>	18-24
A	<p>KRIEG ET AL: "Leukocyte stimulation by oligodeoxynucleotides" APPLIED ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDE TECHNOLOGY, NEW YORK, WILEY-LISS, US, 1998, pages 431-448, XP002131392 Chapter 24 ISBN: 0-471-17279-0</p> <p>—</p>	
P,X	<p>WO 01 12804 A (HYBRIDON INC) 22 February 2001 (2001-02-22) page 9 -page 13 page 14, line 21 - last line claims</p> <p>—</p>	1-24
T	<p>KANDIMALLA, EKAMBAR R. ET AL: "Effect of chemical modifications of cytosine and guanine in a CpG-motif of oligonucleotides: structure-immunostimulatory activity relationships" BIOORGANIC &amp; MEDICINAL CHEMISTRY 9(3), 807-813, March 2001 (2001-03), XP002198015</p> <p>—</p>	
T	<p>YU, D. ET AL: "Modulation of immunostimulatory activity of CpG oligonucleotides by site-Specific deletion of nucleobases" BIOORGANIC &amp; MEDICINAL CHEMISTRY LETTERS (2001), 11(17), 2263-2267, XP002198016</p> <p>—</p>	
1		

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

## Continuation of Box I.2

The application as filed comprises twice claims 18 and 19. For the sake of clarity and consistency, the ISA has renumbered the claims between the first appearing claim 19 and claim 20 as claims 23 and 24.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No  
PCT/US 01/13682

Patent document cited in search report	Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 9849288	A 05-11-1998	AU EP JP WO	7171298 A 0991755 A1 2002505666 T 9849288 A1	24-11-1998 12-04-2000 19-02-2002 05-11-1998
WO 0112804	A 22-02-2001	AU EP WO	6772000 A 1200580 A2 0112804 A2	13-03-2001 02-05-2002 22-02-2001

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	マーク(参考)
A 6 1 P	37/06	A 6 1 P	37/06
C 0 7 H	21/04	C 0 7 H	21/04
C 1 2 N	15/09	C 1 2 N	15/00
// C 1 2 N	5/06		5/00
(81)指定国	E P (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF , BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ , UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE , ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU , LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ , UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW		
F ターム(参考)	4B024 AA01 CA01 CA10 GA18 4B065 AA91X BB17 CA44 4C057 BB05 MM04 MM09 4C084 AA13 MA52 MA55 MA57 MA59 MA60 MA63 NA14 ZB082 ZB092 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 MA52 MA55 MA57 MA59 MA60 MA63 NA14 ZB08 ZB09		